

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Struktura, funkce a farmakologie NMDA receptorů

Structure, function and pharmacology of NMDA receptors

Pavel Švehla

Školitel: MUDr. Ladislav Vyklický, DrSc.

Praha, 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování:

Rád bych na tomto místě poděkoval svému školiteli doktoru Ladislavu Vyklickému za trpělivost a cenné rady k mé práci. Veliký dík patří také magistře Barboře Krausové, bez jejíž pomoci a podnětných připomínek by tato práce nikdy nevznikla.

Abstrakt:

Glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem mezi neurony v centrální nervové soustavě. Jeho působení je zprostředkováno aktivací ionotropních glutamátových receptorů, mezi které patří AMPA, kainátové a NMDA receptory. NMDA receptory hrají klíčovou roli v synaptické plasticitě a excitotoxicitě. Přestože jsou tyto receptory pro správnou funkci mozku nezbytné, jejich nadměrná aktivace může přispívat k patologickým stavům, jako je Huntingtonova choroba, Alzheimerova či Parkinsonova demence. Tato práce podává přehled dostupných poznatků o NMDA podtypu ionotropních glutamátových receptorů, jeho molekulární struktuře a farmakologii a v poslední části se zaměřuje na jeho terapeutický potenciál.

Klíčová slova:

NMDA receptory, glutamát, iontové kanály, alosterická modulace, vodivost

Abstract:

Glutamate is a major excitatory neurotransmitter between neurons in the central nervous system. The effect of glutamate is caused by the activation of distinct ionotropic glutamate channels: AMPA, kainate and NMDA receptors. NMDA receptors play a critical role in the synaptic plasticity and excitotoxicity. Despite the crucial role of these receptors in the right function of the brain, their overexcitation under pathological conditions may result in such neurological disorders as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. The aim of this work is to review available data concerning the molecular structure of NMDA subtype of ionotropic glutamate receptors, their pharmacology and therapeutic potential.

Key words:

NMDA receptors, glutamate, ion channels, allosteric modulation, conductance

Obsah

Seznam zkratk:	1
1 Úvod	2
2 Význam NMDA receptorů	3
3 Struktura NMDA receptorů	3
3.1 Stechiometrie podjednotek	4
3.2 Architektura a symetrie	5
3.2.1 N-koncová doména	6
3.2.2 Ligand-vazebná doména	6
3.2.3 Transmembránová doména	7
3.2.4 C-koncová doména	7
4 Vlastnosti NMDA receptorů	8
4.1 Aktivace receptoru	8
4.2 Mechanismy parciálního agonismu	8
4.3 Mechanismy vrátkování	9
4.4 Mechanismy desenzitizace	9
4.5 Propustnost a mechanismus průniku iontů	10
4.6 Napětově závislá blokáda kanálu endogenními ionty	13
5 Farmakologie NMDA receptorů	14
5.1 Agonisté NMDA receptoru	14
5.1.1 Agonisté GluN1 podjednotky	15
5.1.2 Agonisté GluN2 podjednotky	15
5.1.3 Agonisté GluN3 podjednotky	16
5.1.4 Kompetitivní antagonisté	16
5.1.5 Nekompetitivní antagonisté	16
5.1.6 Akompetitivní antagonisté	17
5.2 Alosterická regulace	17
5.2.1 Bivalentní ionty	17
5.2.2 Protóny	18
5.2.3 Polyaminy	18
5.2.4 Neurosteroidy	19
5.2.5 Nespecifická modulace	20
6 Ontogeneze NMDA receptorů	20
7 Plasticita synapsí	21
8 Terapeutický význam NMDA receptorů	21
8.1 Neuropatická bolest	22
8.2 Schizofrenie	22
8.3 Parkinsonova choroba	22
8.4 Alzheimerova demence	23
9 Závěr	24
10 Seznam použité literatury	25

Seznam zkratek:

3α5βS:	Pregnanolon sulfát
5,7-DCKA:	5,7-dichlorokinurenová kyselina
AD:	Alzheimerova demence
AMPA:	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
ATD:	N-koncová doména (amino-terminal domain)
CNS:	Centrální nervový systém
CTD:	C-koncová doména (carboxy-terminal domain)
EC50:	Poloviční maximální efektivní koncentrace
EPSC:	Excitační post-synaptický proud (excitatory post-synaptic current)
iGluR:	Ionotropní glutamátové receptory
LBD:	Ligand-vazebná doména (ligand-binding domain)
LTD:	Dlouhodobá deprese (long-term depression)
LTP:	Dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)
M(1, 2, 3, 4):	Membránové helixy
NMDA:	N-methyl-D-aspartát
PreM1:	Krátký helix předcházející 1. transmembránovému helixu
PS:	Pregnenolon sulfát
TM (1, 3, 4):	Transmembránové oblasti
TMD:	Transmembránová doména (Transmembrane domain)

1 Úvod

Více než 25 let uběhlo od zjištění, že N-methyl-D-aspartátovými (NMDA) receptory zprostředkovaná synaptická aktivita je důležitá pro modifikaci synapsí a pro vývoj senzorických okruhů v mozku (Kleinschmidt *et al.*, 1987). Od té doby bylo velmi detailně zkoumáno, jak se tyto receptory podílejí na vývoji neuronů. Význam NMDA receptorů je umocněn diverzitou podjednotek a jejich unikátním vývojovým profilem.

Klonování NMDA receptorů v roce 1991 (Moriyoshi *et al.*, 1991) a následná identifikace genů kódujících jejich podjednotky (Monyer *et al.*, 1992) potvrdilo existenci příbuzných, ale přesto významně se lišících genových rodin NMDA a non-NMDA glutamátových receptorů. Tak započala éra buněčných a molekulárně biologických studií NMDA receptorů a jejich role ve funkcích a dysfunkcích mozku. Důležité informace o těchto receptorech poskytly studie na rekombinantních myších modelech. Význam NMDA receptorů v centrální nervové soustavě (CNS) dokládá fenotyp myši knockoutovaných v NMDA receptorech, které umírají brzy po narození kvůli neschopnosti dýchat (Forrest *et al.*, 1994). Nadměrná exprese (overexprese) NMDA receptorů v transgenních myších zlepšuje paměť a schopnost učení u dospělých zvířat (Tang *et al.*, 1999), což dokazuje jejich klíčový význam pro konsolidaci paměti a učení.

Od 80. let dvacátého století na téma NMDA receptorů bylo doposud publikováno téměř deset tisíc prací; to je průměrně tři sta ročně. Je tak nemožné probrat všechny dostupné informace v práci tohoto rozsahu. Cílem této práce je proto zrekapitulovat vybraná témata a přehledně shrnout relevantní literaturu.

1 Význam NMDA receptorů

NMDA receptor patří do třídy ionotropních glutamátových receptorů (iGluR), což jsou iontové kanály aktivované excitační aminokyselinou L-glutamátem (Hayashi, 1954). Od ostatních členů iGluR se tyto receptory farmakologicky odlišují svou citlivostí k syntetickému agonistovi N-methyl-D-aspartátu (NMDA). Tato látka byla syntetizována začátkem 60. let dvacátého století (Curtis *et al.*, 1963) ještě před zjištěním, že L-glutamát je hlavním excitačním neuropřenašečem v CNS obratlovců a že zhruba polovina všech synapsí je glutamátergních. Glutamát uvolněný z presynaptických váčků aktivuje glutamátové receptory na postsynaptické membráně neuronů, mezi které patří: NMDA, kainátové a α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionátové (AMPA) receptory (Traynelis *et al.*, 2010).

Excitační synapse v CNS obsahují AMPA receptory, jež přenáší signály mezi neurony, a NMDA receptory, které spouštějí dlouhodobé změny v synaptickém přenosu – potenciaci či depresi. Je to právě dlouhodobá potenciace (LTP) a dlouhodobá deprese (LTD), co je považováno za buněčný korelát učení a paměti. NMDA receptory proto hrají klíčovou roli v mechanismech paměti a učení (Kessels *et al.*, 2009). Přestože jsou NMDA receptory nezbytné pro správnou funkci CNS, jejich nadměrná aktivace vede k úbytku a poškození neuronů, projevující se v mnoha neurologických poruchách (Chen *et al.*, 2006).

2 Struktura NMDA receptorů

iGluR jsou integrální membránové proteiny složené ze čtyř podjednotek, které tvoří centrální iontový kanál. NMDA receptory tvoří funkční heterotetramery, zatímco AMPA a kainátové receptory jsou obligatorními homotetramery (Kuusinen *et al.*, 1999; Leuschner *et al.*, 1999; Sobolevsky *et al.*, 2009).

Každá podjednotka se skládá z velké extracelulární N-koncové domény (*amino-terminal domain*; ATD), ligand-vazebné domény (*ligand-binding domain*; LBD), transmembránových domén (*transmembrane domains*; TMD) a intracelulární C-koncové domény (*carboxy-terminal domain*; CTD). ATD doména se účastní podjednotkově specifického sestavování receptoru, dopravy na membránu a modulace; LBD odpovídá za vazbu agonisty/kompetitivního antagonisty a aktivaci vrátkování; TMD tvoří iontový kanál a CTD hraje roli v regulaci a lokalizaci receptoru. TMD všech podjednotek se skládá

ze čtyř hydrofóbních úseků; tři tvoří transmembránové oblasti (TM1, TM3 a TM4) a druhý membránový úsek (M2) tvoří intracelulárně orientovanou vratnou kličku, která neprochází membránou (Sobolevsky *et al.*, 2009).

2.1 Stechiometrie podjednotek

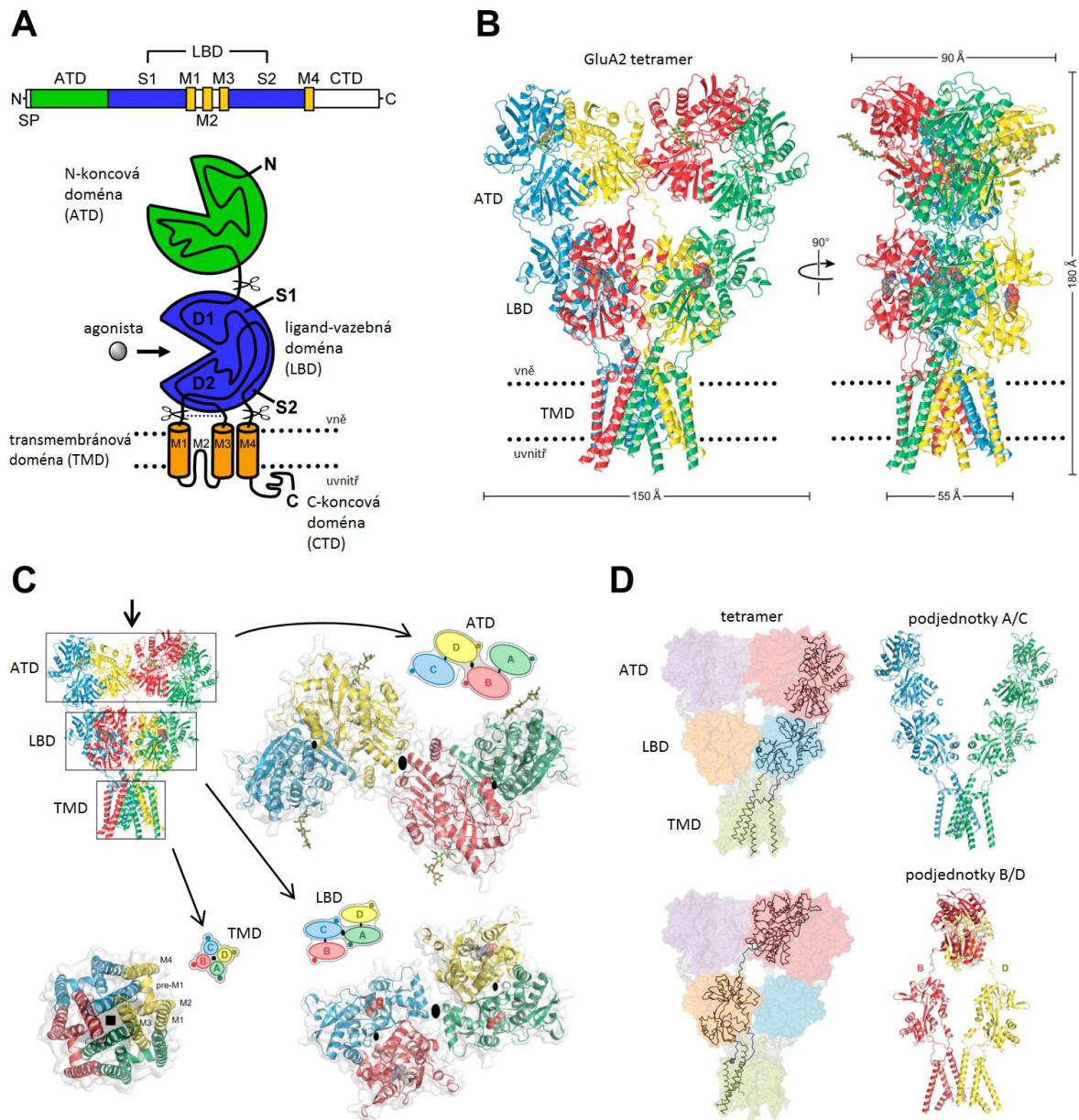
Funkční NMDA receptory jsou tetramerní komplexy složené z podjednotek GluN1 a GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A či GluN3B (Collingridge *et al.*, 2009). NMDA receptory obsahují dvě GluN1 a dvě GluN2 podjednotky nebo dvě GluN1 v kombinaci s GluN2 a GluN3 podjednotkami v uspořádání 1-2-1-2. Kombinací GluN1 s dvěma různými GluN2 podjednotkami vznikají triheteromerní receptory, které mohou být charakteristické pro různé neuronální subpopulace (Brothwell *et al.*, 2008).

Podjednotky receptoru jsou kódovány třemi genovými rodinami. Rodina *Grin1* má jediný gen pro GluN1 podjednotku, *Grin2* pak čtyři geny pro GluN2 (A-D) a GluN3 podjednotky jsou kódovány dvěma geny (A a B) *Grin3* rodiny. Osm variant GluN1 proteinu je produkováno alternativním sestřihem a různě distribuováno v nervovém systému (Dingledine *et al.*, 1999). Sestřihové varianty a specifická skladba receptoru jsou základním kamenem funkční diverzity NMDA receptorů.

Pro aktivaci receptoru je třeba současné vazby jak glutamátu, tak glycinu (Johnson *et al.*, 1987a). GluN1 a GluN3 podjednotky nesou vazebná místa pro glycin (Furukawa *et al.*, 2003) a GluN2 pro glutamát (Furukawa *et al.*, 2005). V případě koexprese GluN1 a GluN3 v oocytech *X. laevis* se tvoří funkční GluN1/GluN3 receptory aktivované pouze glycinem (Chatterton *et al.*, 2002), avšak v neuronech exprimujících GluN3 podjednotky tyto receptory pozorovány nebyly (Matsuda *et al.*, 2003).

Receptor tetramerizuje ze dvou dimerů podjednotek; iniciace nastává složením prvního dimeru a probíhá skrze interakce LBD a TMD (Meddows *et al.*, 2001). Pro skládání NMDA receptorů do heterotetramerů byly navrženy tři modely. První model navrhuje počáteční složení homodimerů GluN1-GluN1 a GluN2-GluN2, které poté formují heterotetramer (Meddows *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2005). Druhý model nabízí variantu, že GluN1-GluN1 tvoří stabilní homodimer, ke kterému se postupně připojují dva GluN2 monomery a vytváří heterotetramer (Atlason *et al.*, 2007). Poslední model je pro formaci iniciálních GluN1-GluN2 heterodimerů a jejich následnou tetramerizaci (Schuler *et al.*, 2008).

2.2 Architektura a symetrie



Obrázek 1. Struktura a organizace glutamátových receptorů. **A:** Schematické uspořádání polypeptidového řetězce jedné podjednotky. Znáznorněná „clamshell-like“ konformace ATD a LBD. **B:** Krystalická struktura tetramerického GluA2 AMPA receptoru (rozlišení 3,6 Å). **C:** Rozhraní mezi ATD, LBD a TMD doménami čtyř podjednotek v GluA2 AMPA receptoru. Zobrazeno shora dolů; je patrná dvojčetná symetrie ATD a LBD domén, zatímco TMD je symetrická dle osy čtyřčetné. **D:** Záměna domén (domain swapping) mezi LBD a ATD doménami a překřížení podjednotek. Převzato z (Sobolevsky *et al.*, 2009).

Navzdory rozdílným funkčním vlastnostem má rodina iGluR shodnou strukturu podjednotek. Extracelulární domény receptoru jsou organizovány jako lokální dimery; tyto dimery spolu dále dimerizují a vytvářejí stabilní heterotetramer, který zaujímá konformaci s celkovou dvojčetnou symetrií. Transmembránové domény s iontovým kanálem pak vykazují rotační symetrii podle osy čtyřčetné. K přechodu symetrie z dvojčetné na čtyřčetnou dochází v důsledku párování dvou konformačně odlišných podjednotek, A/C a B/D (viz Obr. 1C) (Sobolevsky *et al.*, 2009).

2.2.1 N-koncová doména

Byly provedeny pokusy, kde mutantní podjednotky postrádaly celou ATD, a tyto zkrácené podjednotky se uspořádávaly do receptorů funkčně identických s divokými typy. Zkrácení však mělo vliv na pravděpodobnost otevření, alosterickou modulaci, deaktivaci, desenzitizaci a specifitu sestavování receptoru (Yuan *et al.*, 2009). ATD obsahuje vazebná místa pro bivalentní kationty jako Zn^{2+} (Fayyazuddin *et al.*, 2000), podjednotkově selektivní negativní alosterický modulátor ifenprodil (Karakas *et al.*, 2009) a v neposlední řadě vazebná místa pro extracelulární proteiny, jako např. N-kadherin (Saglietti *et al.*, 2007).

V úrovni N-koncových domén lze podle celkové symetrie definovat podjednotky A/C jako distální a B/D jako proximální (viz Obr. 1C). ATD hraje klíčovou roli ve specifitě sestavování a stabilitě receptoru, což lze na molekulární úrovni vysvětlit vzájemným překřížením distálních a proximálních podjednotek na úrovni přechodu ATD a LBD (Sobolevsky *et al.*, 2009).

2.2.2 Ligand-vazebná doména

LBD jsou vysoce konzervované v rámci různých receptorových tříd a jsou tvořené dvěma extracelulárními úseky aminokyselin, S1 a S2, které mají podobně jako ATD škeblovitý tvar (*clamshell-like*). Vazebná kapsa pro agonistu se nachází mezi těmito dvěma laloky, označenými D1 a D2 (viz Obr. 1A) (Sobolevsky *et al.*, 2009).

Na úrovni LBD je uspořádání lokálních dimerů iontového kanálu odlišné od úrovně ATD; tento jev je označován jako „záměna domén“ (z anglického *domain swapping*; viz Obr. 1D). Dle celkové dvojčetné symetrie jsou LBD dimery v důsledku překřížení mezi doménami tvořeny podjednotkami A/D a B/C, přičemž ke kontaktu dochází mezi A/C podjednotkami (viz Obr. 1C).

GluN3 podjednotky, podobně jako GluN1, váží glycin a můžou spolu s dalšími podjednotkami tvořit NMDA receptory. Receptory obsahující GluN3 podjednotky mají charakteristický expresní profil, jsou ale zároveň nejméně prozkoumanými příslušníky genové rodiny NMDA receptorů. LBD obou GluN3 podjednotek se ligandem uzavírají ve stejném rozsahu jako LBD GluN1; LBD GluN3 ale mají charakteristickou obloukovou strukturu, která je odlišuje od všech ostatních podjednotek glutamátových receptorů. Tato struktura se při vazbě agonisty pohybuje točivým způsobem, který je pro GluN3 jedinečný a stabilizuje zavřený stav vazebné štěrby (Yao *et al.*, 2008).

2.2.3 Transmembránová doména

TMD každé podjednotky obsahuje 3 transmembránové helixy (M1, M3 a M4), jednu membránovou kličku (M2) a krátký helix orientovaný paralelně s membránou (Pre-M1). M1, M2 a M3 z každé podjednotky přispívají k tvorbě iontového kanálu, zatímco M4 primárně zajišťuje kontakt se sousední podjednotkou. TMD jsou s LBD vázány pomocí třech krátkých linkerů (Sobolevsky *et al.*, 2009). TMD jsou vysoce konzervované v rámci rodiny glutamátových receptorů, což je dále podpořeno skutečností, že bakteriální K⁺ kanál GluR0 se savčími glutamátovými receptory sdílí silnou funkční i strukturní homologii (Chen *et al.*, 1999).

M2 a M3 helixy mají vrcholy těsně proti sobě, a proto se předpokládá, že tvoří vrátka iontového kanálu. M4 segment jedné podjednotky je asociován s jádrem iontového kanálu (M1-M3) sousední podjednotky. Pre-M1 helixy všech čtyř podjednotek vytváří manžetu kolem horní části kanálové domény, která udržuje pohromadě C a N-konce M3 a M4 helixů. Pre-M1 je důležitou determinantou pro vrátkování kanálu (Sobolevsky *et al.*, 2009). Pro selektivitu kanálu hraje významnou roli M2 vratná smyčka, která na svém vrcholku nese tzv. QRN místo, jež v různých receptorech obsahuje jednu klíčovou aminokyselinu, a to buď glutamin, arginin nebo asparagin (Kuner *et al.*, 1996; Wollmuth *et al.*, 1996).

2.2.4 C-koncová doména

CTD je nejméně konzervovanou strukturou glutamátových receptorů, liší se aminokyselinovou sekvencí i její délkou. CTD je připisován vliv na povrchovou expresi receptoru a posttranslační modifikace (Hayashi *et al.*, 2009), jakož i na degradaci (Bi *et al.*, 1998). Regulovaná modifikace CTD tudíž může mít význam v NMDA receptory zprostředkované synaptické plasticitě (Hayashi *et al.*, 2009). Obsahuje také různá

fosforylační místa pro kinázy rodiny *src* a vazebná místa pro intracelulární proteiny, důležité pro regulaci funkce receptoru (Hayashi *et al.*, 2009; Vissel *et al.*, 2001). Pro některé podjednotky iGluR proto delece této domény neznamena ztrátu funkce, ale změnu regulace (Krupp *et al.*, 1998).

3 Vlastnosti NMDA receptorů

Ačkoli NMDA, AMPA a kainátové receptory mají příbuznou aminokyselinovou sekvenci, liší se svou funkcí. Kinetika NMDA receptorů je relativně pomalá, časový průběh aktivace a deaktivace probíhá na škále desítek až stovek milisekund. Naproti tomu kinetika non-NMDA receptorů je v řádu milisekund, neboť jejich afinita k endogennímu přenašeči glutamátu je nízká, proto se rychle deaktivují jeho disociací z receptoru. Společnou vlastností AMPA a NMDA receptorů je desenzitizace. V případě AMPA receptorů je desenzitizace rychlejší a hlubší, než je tomu u NMDA receptorů (Jahr *et al.*, 1985).

3.1 Aktivace receptoru

Princip vazby agonisty a vrátkování kanálu se zdá být stejný pro všechny podtypy glutamátových receptorů. Počáteční krok aktivace receptoru je vazba agonisty na LBD, která indukuje zavření vazebné kapsy. Tato konformační změna spouští následný přechod iontového kanálu do otevřeného stavu: D2 lalok se hýbe, uzavírá vazebnou kapsu, a spouští změnu konformace krátkých segmentů spojujících TMD a LBD, což vede k přeuspořádání M3 helixu a následnému otevření kanálu (Erreger *et al.*, 2004; Mayer, 2006). Posun D1 a D2 laloků vůči sobě se však projevuje nestabilitou LBD a TMD rozhraní. Stabilita je obnovena znovuotevřením LBD, což je krok vedoucí k disociaci agonisty, a předpokládá se, že je to i krok předcházející zavření kanálu (popřípadě změně vodivosti kanálu). Další varianta snížení stability rozhraní LBD a TMD může ve výsledku vést ke změně uspořádání dimeru, což receptoru umožňuje vstoupit do desenzitizovaného stavu (Jin *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002).

3.2 Mechanismy parciálního agonismu

Parciální agonismus byl popsán u všech typů glutamátových receptorů. Parciální agonisté se váží na stejné vazebné místo jako agonista, avšak mají odlišné relativní účinky na vodivost receptoru. Strukturní studie LBD GluN1 však nenaznačují žádný podstatný rozdíl

v uzavírání vazebné štěrbině při vazbě úplného agonisty glycinu, parciálního agonisty D-cykloserinu a dalších sérií strukturně příbuzných parciálních agonistů. NMDA receptory proto nemají vztah mezi stupněm agonistou indukovaného zavření vazebné štěrbině a účinností vrátkování, jak je tomu u AMPA receptorů (Furukawa *et al.*, 2003).

3.3 Mechanismy vrátkování

Ve všech podjednotkách glutamátových receptorů jsou tři transmembránové helixy (M1, M3, M4) přímo spojeny s LBD. Na základě přípravy *Lurcher* M3 mutantu GluD2(A654T), který produkuje konstitutivně aktivní kanály, bylo zjištěno, že M3 segment je klíčovým prvkem při vrátkování receptorů (Zuo *et al.*, 1997). Oblast M3 helixu obsahuje nejkonzervovanější motiv mezi glutamátovými receptory savců, a sice aminokyselinovou sekvenci SYTANLAAF (Kuner *et al.*, 2003). Helix M3 je navíc homologní k větší vrátkovací doméně K⁺ kanálů (Doyle *et al.*, 1998).

Sobolevsky *et al.* (2009) ve své práci navrhli, že se vrátka otvírají rotací M3 helixu směrem od centrální osy póru, stejným způsobem jako u K⁺ kanálů, avšak s jedním podstatným strukturním rozdílem: glutamátové receptory postrádají glycinový „závěs“ ve svém M3 helixu, který je pro draslíkové kanály esenciální (Doyle *et al.*, 1998), proto mechanismus konformačních změn M3 helixu není pro oba typy receptorů stejný.

Příspěvky M1 a M4 transmembránových helixů k funkci kanálu jsou neznámé; některá data dokládají, že mutace v M1 (Krupp *et al.*, 1998) a M4 (Ren *et al.*, 2003) mohou pozměnit vrátkování. M1 a M4 mohou také fungovat jako kotvy pro LBD, které přenáší konformační změny na iontový kanál. Vzhledem k tomu, že M4 je v receptorovém komplexu blíže membráně než M3, jeho další funkcí může být snižování interakce M3 vrátkovacího elementu s dvojvrstvou membrány (Sobolevsky *et al.*, 2009). M4 segment se zdá být nezbytný pro funkci NMDA receptorů, jelikož podjednotky zkrácené o M4 helix NMDA receptoru nevykazují detekovatelný proud při aktivaci glutamátem (Schorge *et al.*, 2003).

3.4 Mechanismy desenzitizace

Desenzitizace byla poprvé objevena v roce 1992 u acetylcholinového receptoru (Pitchford *et al.*, 1992). Jde o agonistou navozený stav, kdy je receptor refrakterní vůči dalšímu podání agonisty. Všechny glutamátové receptory podstupují desenzitizaci. Nástup desenzitizace je u NMDA receptorů pomalejší a méně rozsáhlý než u receptorů

non-NMDA. U receptorů obsahujících GluN2C a GluN2D podjednotku desenzitizace v podstatě chybí (Dravid *et al.*, 2008; Wyllie *et al.*, 1998).

Desenzitizace NMDA receptorů může probíhat mnoha způsoby, které zahrnují glycin dependentní desenzitizaci (Mayer *et al.*, 1989), Ca^{2+} dependentní inaktivaci (Vyklicky, 1993), Zn^{2+} dependentní desenzitizaci a glycin/ Ca^{2+} nezávislou desenzitizaci (Chen *et al.*, 2004). Molekulární mechanismy těchto způsobů desenzitizace však nebyly dosud uspokojivě objasněny.

3.5 Propustnost a mechanismus průniku iontů

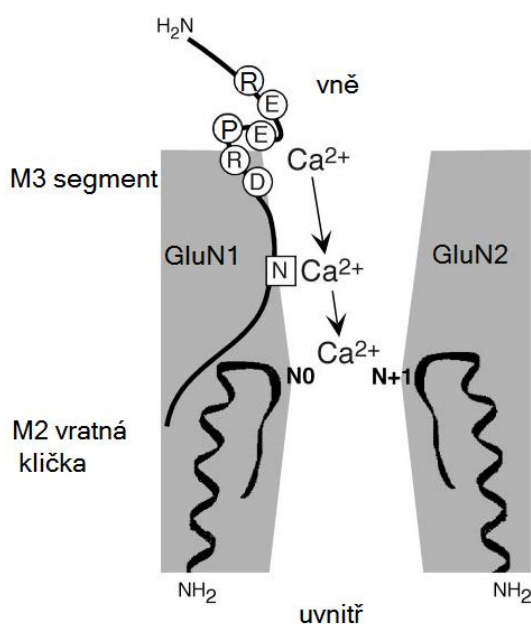
Iontový kanál asociovaný se všemi glutamátovými receptory je složen z póru vyplněného roztokem, který se skládá z vnější a vnitřní dutiny, oddělené centrálním zúžením, kde pór dosahuje nejmenšího průměru a které je centrem jeho selektivity. Kanál je se vzácnými výjimkami kationtově selektivní se širokým rozsahem vodivosti kanálu, která u NMDA receptorů nabývá hodnot od 20 do 60 pS (Dravid *et al.*, 2008) a u AMPA a kainátových receptorů dosahuje od <1 do 30 pS (Prieto *et al.*, 2010; Swanson *et al.*, 1996).

Klíčovou vlastností určující propustnost a vodivost kanálu jsou pozice aminokyselin ležících v tzv. QRN místě (aminokyseliny Gln, Arg a Asn) (Kuner *et al.*, 1996), které se nachází na vrcholku M2 klíčky, umístěné ve vnitřní dutině v blízkosti centrálního zúžení (Sobolevsky *et al.*, 2009). V tomto místě mají GluN1 a GluN2 NMDA receptory Asn (N), v případě GluN3 je to Gly (G). V non-NMDA receptorech je to pak Gln (Q, needitováno), nebo Arg (R, po editaci) (Burnashev *et al.*, 1992). Strukturní pozice QRN místa kriticky ovlivňuje vodivost kanálu (Traynelis *et al.*, 1997), propustnost pro Ca^{2+} ionty (Burnashev *et al.*, 1992), blokování polyaminy (Bowie *et al.*, 1995), citlivost k Mg^{2+} (Burnashev *et al.*, 1992), blokování kanálu organickými látkami (Chen *et al.*, 2005) a spojování do heteromerních komplexů (Greger *et al.*, 2003).

Hlavní determinanta iontové selektivity vychází z fyzikálních a elektrických interakcí procházejícího iontu s nejužší částí iontového póru. Zjištění, že kanály obsahující ve QRN místě arginin mají skoro stejný průměr jako kanály obsahující v QRN místě menší glutamin, vedlo k formulaci hypotézy, že postranní řetězce atomů QRN místa nedefinují průměr nejužšího místa póru, nýbrž jejich efekt na selektivitu se může odehrávat prostřednictvím elektrostatických interakcí (Kuner *et al.*, 2001).

Vlastnosti kanálu mohou být ovlivněny počtem iontů, které procházejí pórem. Studie NMDA receptorů dokazují, že pór obsahuje jen jeden procházející ion (Zarei *et al.*, 1994). V případě vysoce selektivních K^+ kanálů interakce mezi selektivním místem a procházejícím iontem snižuje v oblasti zúžení volnou energii. Ionty prochází pórem za sebou a vytvářejí ion-ion interakce, které jsou kritické pro vysokou míru vodivosti (Morais-Cabral *et al.*, 2001). Naproti tomu u glutamátového receptoru s větším selektivním průměrem je interakce iontu se stěnou póru slabší, což může bránit obsazování póru více ionty. NMDA receptory mohou pór energeticky přizpůsobit blokující částici a dalším pronikajícím iontům, a tato dodatečná vazebná místa pro procházející ionty mohou významně přispívat k selektivitě, vodivosti a blokaci kanálu (Antonov *et al.*, 1999).

Proud vedený skrze libovolný glutamátový receptor je směsí monovalentních kationtů (K^+ , Na^+) a Ca^{2+} (Mayer *et al.*, 1987). NMDA receptory jsou přibližně třikrát až čtyřikrát propustnější pro Ca^{2+} než receptory AMPA a kainátové (Wollmuth *et al.*, 1998). Míra propustnosti NMDA receptorů pro Ca^{2+} je řízena podjednotkovým složením: receptory obsahující GluN2A/GluN2B jsou nejpropustnější, GluN2C méně propustné a GluN3A propustné nejméně (Burnashev *et al.*, 1995; Schneggenburger, 1996). Přítomnost GluN3 podjednotek v receptoru tak vede ke snížené relativní propustnosti pro Ca^{2+} ionty (Perez-Otano *et al.*, 2001). Rozsah vtoku Ca^{2+} je také regulován fosforylací NMDA receptoru (Skeberdis *et al.*, 2006). Přestože jsou NMDA receptory pro Ca^{2+} ionty vysoce propustné, jsou jimi zároveň blokovány napětově nezávislým způsobem (Ascher *et al.*, 1988).



Obrázek 2: Schematický model vtoku Ca^{2+} NMDA receptorem. M2 vratná klička a M3 helix jsou znázorněny tlustými čarami. Centrální zúžení je umístěno přibližně na vrcholku M2 vratné kličky, v polovině napříč kanálem. Je tvořeno asparaginy v nehomologních pozicích: v případě GluN1 podjednotek v N místě, u GluN2 v místě N+1. Převzato z (Watanabe *et al.*, 2002).

Propustnost pro Ca^{2+} ionty je ovlivněná aminokyselinovými zbytky v QRN místě. NMDA receptory, u nichž je asparagin z QRN místa mutován za jinou aminokyselinu, mají sníženou propustnost pro Ca^{2+}

(Burnashev *et al.*, 1992). Některé aminokyseliny poblíž QRN místa mohou také ovlivnit permeabilitu pro Ca^{2+} a to buď přímo, nebo pozměněním struktury M2 kličky. Jedním takovým zbytkem je negativně nabitý glutamát na M2 kličce GluN1 podjednotky nacházející se v pozici 603, 5 aminokyselin od QRN místa, jehož záměnou za pozitivně nabitý lysin poklesne propustnost pro Ca^{2+} (Schneggenburger, 1998). V GluN2A podjednotce je pozice 620 obsazena polárním glutaminem, jehož nahrazení za glutamát (podobně jako je tomu v GluN2C podjednotkách, které mají sníženou relativní Ca^{2+} permeabilitu) také vede ke snížení Ca^{2+} propustnosti (Vissel *et al.*, 2002). Tato pozice by tedy mohla být příčinou rozdílu v Ca^{2+} propustnosti mezi GluN2 podjednotkami. Nicméně není zřejmé, zda Ca^{2+} interaguje přímo s postranními řetězci molekul v této pozici, anebo tato mutace mění strukturu QRN místa (Kuner *et al.*, 1996).

Pravděpodobným důvodem vysokého vtoku Ca^{2+} iontů NMDA receptory je, alespoň částečně, vnější Ca^{2+} vazebné místo (Premkumar *et al.*, 1996). Znakem tohoto vazebného místa je shluk nabitých aminokyselinových zbytků, takzvaný DRPEER motiv, umístěný na M3 helixu, který je jedinečný pro GluN1 podjednotku (viz Obr. 2) (Watanabe *et al.*, 2002). Tento motiv je lokalizován u vnějšího vstupu kanálu (Beck *et al.*, 1999) a celkově nese negativní náboj, daný třemi negativně a jednou pozitivně nabitou aminokyselinou. Mutantní kanály, ve kterých byl tento motiv substituován za neutrální aminokyseliny, měly hodnoty proudů snížené zhruba na polovinu (Watanabe *et al.*, 2002), což vedlo k navržení tohoto úseku jako části zodpovědné za vysoké dílčí Ca^{2+} proudy NMDA receptorů. Substituce asparaginu v QRN místě AMPA receptorů, která by měla zúžení kanálu teoreticky připodobit NMDA receptorům, vedla pouze k mírnému vzrůstu dílčích Ca^{2+} proudů (od 4% do 5%) (Wollmuth *et al.*, 1998). Tím bylo navrženo, že různé vlastnosti transportu Ca^{2+} mezi glutamátovými receptory mohou být odrazem více vazebných míst (DRPEER) u NMDA receptorových kanálů oproti non-NMDA receptorům, které mají vazebné místo jen jediné (Jatzke *et al.*, 2003).

GluN3 přímo ovlivňuje strukturu dráhy průniku iontů, což dokazuje snížená kanálová vodivost, snížená permeabilita pro Ca^{2+} ionty a redukovaný Mg^{2+} blok v případě kanálů koexprimujících podjednotku GluN3 společně s GluN1 či GluN2 podjednotkami (Matsuda *et al.*, 2003; Perez-Otano *et al.*, 2001)

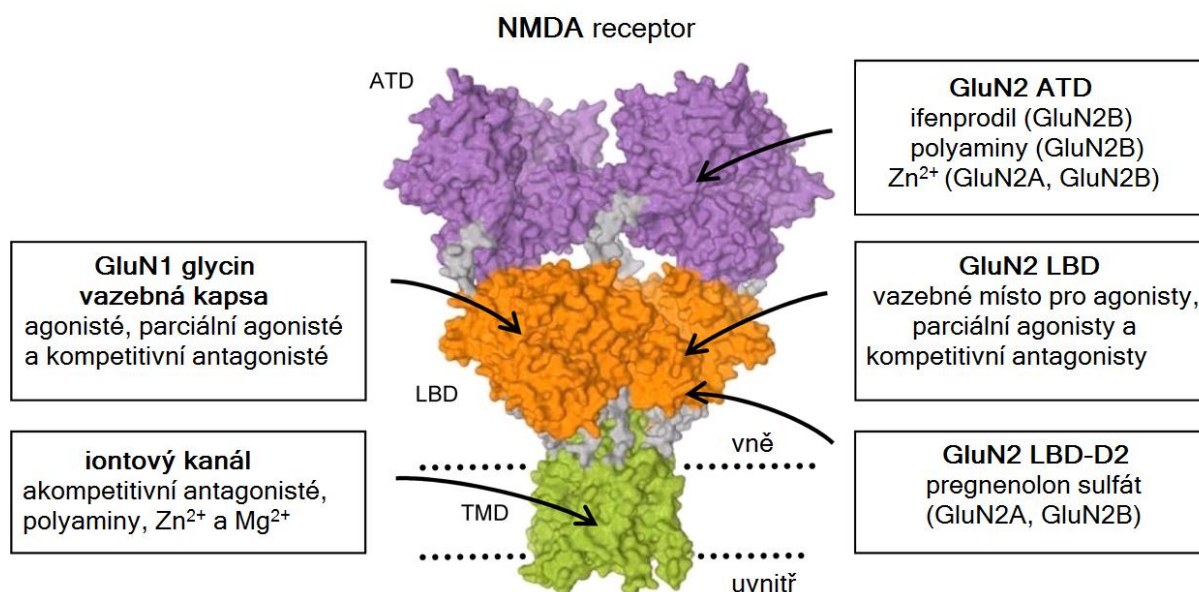
3.6 Napětově závislá blokáda kanálu endogenními ionty

Funkci glutamátových receptorů může modulovat množství endogenních iontů, včetně protonů (Giffard *et al.*, 1990), Zn^{2+} (Peters *et al.*, 1987), Mg^{2+} (Mayer *et al.*, 1984) a polyaminů (Traynelis *et al.*, 1995). Některé z těchto endogenních faktorů (Zn^{2+} , Mg^{2+} a polyaminy) blokují napětově závislým mechanismem, což má důležité dopady na funkci neuronu.

Mg^{2+} blokáda je pravděpodobně nejcharakterističtější vlastností NMDA receptorů. Jelikož je tato vlastnost silně napětově závislá, receptor proto lze odblokovat postsynaptickou depolarizací. Hlavní vazebné místo pro Mg^{2+} se nachází blízko zúžení, lokalizovaného zhruba v polovině napříč kanálem (Premkumar *et al.*, 1996). Napětově závislá Mg^{2+} blokáda je částečně způsobena přítomností vazebných míst pro procházející ionty ve vnější i ve vnitřní dutině póru iontového kanálu. Obsazenost těchto míst Na^+ nebo K^+ ionty mění rychlost asociace a disociace Mg^{2+} ze svého vazebného místa (Antonov *et al.*, 1999). Vlastnosti vazebných míst pro Mg^{2+} se liší mezi GluN2 podjednotkami: receptory obsahující GluN2C nebo GluN2D podjednotky se odblokovují rychleji než ty obsahující GluN2A nebo GluN2B podjednotky (Clarke *et al.*, 2006).

Mg^{2+} může blokovat kanál, pouze když vnější vazebná místa pro ionty nejsou obsazena; pokud obsazena jsou, ionty brání přístupu Mg^{2+} do ústí kanálu. Po odblokování může Mg^{2+} buď disociovat zpět do vnějšího prostředí, nebo projít kanálem dovnitř. Disociaci Mg^{2+} do vnějšího prostředí může zabránit obsazení vnějších vazebných míst Na^+ nebo K^+ ionty, ke kterému dochází během blokády iontového kanálu Mg^{2+} ; průniku iontu kanálem dovnitř však nic nebrání (Antonov *et al.*, 1999).

4 Farmakologie NMDA receptorů



Obrázek 3: Souhrnný přehled vazebných míst pro agonisty, antagonisty a další modulátory NMDA receptoru. Převzato z (Traynelis *et al.*, 2010)

4.1 Agonisté NMDA receptoru

NMDA receptory ke své aktivaci vyžadují současnou vazbu glycinu na GluN1 podjednotku a glutamátu na GluN2 podjednotku, a zároveň depolarizaci membrány pro odstranění Mg^{2+} bloku (Johnson *et al.*, 1987b; Mayer *et al.*, 1984; Vyklicky *et al.*, 1990a).

Ve struktuře LBD GluN1 podjednotky NMDA receptoru a GluA2 podjednotky AMPA receptoru jsou signifikantní rozdíly, ačkoliv jejich celková symetrie je totožná. Asi nejvýraznější je různá konformace při vazbě agonisty, kdy LBD GluN1 zaujímá kompaktnější strukturu než LBD GluA2. Aminokyseliny ve vazebném místě pro agonistu jsou v rámci skupiny glutamátových receptorů značně konzervovány. Mezi vazebnými místy NMDA a AMPA receptorů jsou ale dva kritické rozdíly. V GluA2 podjednotce je 655. zbytkem threonin, jehož hydroxylová skupina tvoří vodíkový můstek s γ -karboxylovým kyslíkem glutamátu; příslušnou aminokyselinou v GluN1 je Val689, který podobnou interakci nemůže vytvořit (Furukawa *et al.*, 2003).

Druhým klíčovým rozdílem je přítomnost Trp731 v GluN1, který by ve vazebné kapse GluA2 kolidoval s γ -karboxyskupinou glutamátu. V GluA2 je ve stejné pozici Leu704, který díky menšímu objemu vazbě glutamátu nepřekáží. Podjednotky GluN2 díky

menšímu postrannímu řetězci Tyr730 mohou s γ -karboxylátem vytvářet van der Waalsovu vazbu. Krystalografická data nenaznačují korelaci mezi uzavřením D1 a D2 domén a relativní účinností agonisty, jak je tomu u LBD GluA2 podjednotek (Furukawa *et al.*, 2003).

4.1.1 Agonisté GluN1 podjednotky

Agonisté GluN1 podjednotky jsou kromě glycinu také L- a D- isomery serinu a alaninu. Vazebné místo pro glycin je však stereoselektivní; D-isomery alaninu a serinu jsou přibližně dvacetkrát až třicetkrát účinnější než L-isomery (McBain *et al.*, 1989). D-serin, což je v podstatě hydroxymethylovaný glycin, může být primárním ligandem GluN1 podjednotek v některých oblastech mozku, jako například supraoptickém jádře (Pاناتier *et al.*, 2006). D-serin je syntetizován z L-serinu pomocí serin-racemázy. Delece genu pro racemázu ovlivňuje glutamátergní synaptický přenos, což se projevuje změnami chování (Basu *et al.*, 2009).

Cyklické a halogenované analogy glycinu, například D-cykloserin, účinkují na GluN1 podjednotkách jako parciální agonisté; ačkoli účinek na receptory obsahující GluN1/GluN2C podjednotku je větší, než vyvolává glycin (Dravid *et al.*, 2010). Přítomnost různých typů GluN2 podjednotek v glutamátových receptorech určuje míru potenciace GluN1 agonistů, s nejnižším účinkem (nejvyšší poloviční účinná koncentrace — EC_{50}) na GluN1/GluN2A receptory a nejvyšším účinkem (nejnižší EC_{50}) na GluN1/GluN2D receptory (Erreger *et al.*, 2007).

4.1.2 Agonisté GluN2 podjednotky

Mezi endogenní agonisty GluN2 podjednotek patří glutamát, L- a D-aspartát (Benveniste, 1989; Zhang *et al.*, 2009), homocysteát a cysteinsulfinát (Do *et al.*, 1986). Relativní účinnost agonistů GluN2 podjednotek je obecně stupňována od receptorů obsahujících GluN2A k GluN2D podjednotkám, přičemž nejslaběji jsou potencovány NMDA receptory s GluN2A podjednotkou a nejsilněji receptory obsahující GluN2D (Monyer *et al.*, 1992). Navzdory vysoké sekvenční homologii a konzervovanosti aminokyselinových zbytků ve vazebném místě GluN2A a GluN2D podjednotek zaujímá glutamát při vazbě odlišnou orientaci. Tato skutečnost může být využita pro vývoj podjednotkově selektivních agonistů a kompetitivních antagonistů (Erreger *et al.*, 2007).

4.1.3 Agonisté GluN3 podjednotky

GluN3 váží glycin odlišně než GluN1 podjednotky. Glycin a D-serin se váží do vazebné štěrby tvořené D1 a D2 doménami. Ligand-vazebné domény GluN1 a GluN3 jsou jen zhruba z 30% homologní a afinita glycinu k izolovaným GluN3 LBD je více než 600krát vyšší než k izolovaným LBD GluN1 (Yao *et al.*, 2006).

4.1.4 Kompetitivní antagonisté

Bylo identifikováno mnoho kompetitivních antagonistů GluN1 podjednotek, například 7-chlorokynurenová kyselina či její analog 5,7-dichlorokynurenová kyselina (5,7-DCKA). LBD GluN1 vykazuje při navázání 5,7-DCKA o 24° menší uzavření oproti stavu s navázaným glycinem; tento poznatek naznačuje, že antagonistu stabilizuje otevřenou konformaci domény (Furukawa *et al.*, 2003). Přítomnost různých GluN2 podjednotek v NMDA receptoru rovněž ovlivňuje účinnost těchto antagonistů (Priestley *et al.*, 1995).

Inhibice NMDA receptorů anestetickými plyny může hrát důležitou roli v anestezii a neuroprotekcí. Inhibice NMDA receptorů xenonem a isofluranem se zvyšuje se snižující se koncentrací glycinu, což mezi těmito molekulami naznačuje kompetitivní inhibici. Anestetika působící antagonisticky na glycinovém místě NMDA receptorů postrádají vedlejší psychotomimetické účinky, a tudíž jsou pacienti velmi dobře tolerovány (Dickinson *et al.*, 2007).

Selektivity kompetitivních antagonistů NMDA receptorů je obtížné dosáhnout kvůli vysoké homologii mezi LBD GluN2 podjednotek. Ze 39 aminokyselin lemujících vazebnou kapsu se jich pouze 8 liší mezi GluN2 podjednotkami a všech 10 aminokyselin, které přicházejí do přímého kontaktu s glutamátem, je plně konzervováno (Furukawa *et al.*, 2005).

4.1.5 Nekompetitivní antagonisté

První objevený podjednotkově specifický antagonistu NMDA receptoru byl polyethanolamin ifenprodil, který tak definoval třídu nekompetitivních, napěťově nezávislých parciálních inhibitorů NMDA receptorů, obsahujících GluN2B podjednotku. Ifenprodil inhibuje GluN1/GluN2B receptory s vysokou afinitou a 200 až 400krát větším účinkem než ostatní kombinace GluN1/GluN2 podjednotek (Williams, 1993). Při saturujících koncentracích je inhibice neúplná, což naznačuje, že může působit také jako negativní alosterický modulátor; avšak v široké literatuře je uváděn jako

nekompetitivní antagonist. Stejně jako vazba Zn^{2+} na ATD podjednotku GluN2A, i vazba ifenprodilu zvyšuje potenci protonové inhibice NMDA receptorů (Pahk *et al.*, 1997).

4.1.6 Akompetitivní antagonisté

Blokátory otevřeného kanálu vyžadují, aby byl iontový kanál otevřený, čímž dojde k odhalení jejich vazebného místa (Huettner *et al.*, 1988). Kvůli tomuto požadavku je nástup inhibice pomalý a zvyšuje se s rostoucí pravděpodobností otevření kanálu. Po zavření kanálu mohou být některé blokátory zachyceny v póru; v anglické literatuře se tyto látky nazývají *trapping* blokátory či *partial trapping* blokátory. Odstranění takového bloku trvá déle a vyžaduje opětovnou aktivaci receptoru agonistou (Blanpied *et al.*, 1997; Parsons *et al.*, 1995).

Mezi akompetitivní antagonisty NMDA receptorů patří Mg^{2+} , polyaminy, dále anestetika fenylcyklidin a ketamin a v poslední řadě deriváty amino-adamantanu: memantin a amantadin (Traynelis *et al.*, 2010). *Partial trapping* blokátory, například memantin a amantadin, se váží po otevření kanálu. Z části zablokovaných receptorů jsou pak tyto blokátory samovolně uvolněny a jejich účinek tak rychle odeznívá (Blanpied *et al.*, 1997). To by mohlo mít terapeutický význam, jelikož normální synaptický přenos by nemusel být blokátorem ovlivněn, ale nadměrná aktivace NMDA receptorů by se měla snížit. Blokátorů otevřeného kanálu lze využít jako účinných léků proti NMDA receptory zprostředkované neurotoxicitě (Chen *et al.*, 2006).

4.2 Alosterická regulace

4.2.1 Bivalentní ionty

Mnoho bivalentních kationtů ovlivňuje aktivaci glutamátových receptorů, napětově závislou blokádu, potenciaci a inhibici receptorových odpovědí. Z těchto iontů nejsilněji inhibuje glutamátové receptory Zn^{2+} (Mayer *et al.*, 1987; Peters *et al.*, 1987). Velké množství Zn^{2+} je přítomno v synaptických zakončeních CNS a Zn^{2+} může být vylučován během synaptické aktivity (Peters *et al.*, 1987). Zn^{2+} ionty se váží na GluN2A (Fayyazuddin *et al.*, 2000) a GluN2B podjednotky (Rachline *et al.*, 2005), takže exprese různých GluN2 podjednotek umožňuje funkci Zn^{2+} jako endogenního modulátoru NMDA receptorů v závislosti na synaptické koncentraci Zn^{2+} .

Inhibice Zn^{2+} ionty je bifazická a zahrnuje jak napětově-závislou, tak napětově-nezávislou komponentu. Napětově nezávislá inhibice je vysokoafinní, probíhající při nízkých koncentracích Zn^{2+} ; druhá fáze inhibice probíhá kvůli napětově závislému bloku při vyšších koncentracích (Legendre *et al.*, 1990). Jak dokládá nedávná krystalografická studie, vysokoafinní vazebné místo pro Zn^{2+} se nachází v ATD (Karakas *et al.*, 2009) a vazba pravděpodobně zahrnuje koordinaci s histidinovými zbytky (Fayyazuddin *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 1999). Nízkoafinní napětově závislá Zn^{2+} inhibice se odehrává na aminokyselinových zbytcích M2 helixu, stejně jako vazba Mg^{2+} (Legendre *et al.*, 1990; Paoletti *et al.*, 2000).

Mezi vazbou glutamátu k LBD a vazbou Zn^{2+} k ATD existuje pozitivní alosterický efekt. Tato interakce má význam pro rychlou desenzitizaci, která je důležitým regulačním mechanismem funkce NMDA receptorů. Hypotéza navrhuje, že desenzitizace receptoru a relaxace proudů je důsledkem zvýšení afinity Zn^{2+} po vazbě glutamátu na receptor, která vede k nové rovnováze vazby Zn^{2+} (Erreger *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2001).

4.2.2 Protony

NMDA receptory jsou na rozdíl od AMPA receptorů citlivé k pH. Protony inhibují receptory bez změny ionizace agonisty (Vyklícky *et al.*, 1990b). Různé GluN1/GluN2 NMDA receptory se při fyziologickém pH liší hodnotou poloviční maximální inhibiční koncentrace pro vodíkové ionty, což naznačuje, že NMDA receptory mohou být tonicky inhibovány (Traynelis *et al.*, 1995). Protonová inhibice závisí na alternativním splicingu RNA GluN1 podjednotek (Traynelis *et al.*, 1995) a na asociaci se Zn^{2+} ionty (Gielen *et al.*, 2008) či ifenprodilem (Mott *et al.*, 1998).

Inhibice protony je nezávislá na napětí a vazbě ligandu; protony snižují pravděpodobnost otevření kanálu bez změny desenzitizace a deaktivace (Banke *et al.*, 2005). Studie používající skenovací mutagenезi odhalila shluk aminokyselinových zbytků, které zprostředkovávají citlivost k pH. Jedná se o oblast na M3 helixu s konzervovanou SYTANLAAF sekvencí, která je kritická pro vrátkování; tato oblast podstupuje při vrátkování pH-citlivé pohyby (Sobolevsky *et al.*, 2009).

4.2.3 Polyaminy

Extracelulární polyaminy jako spermin a spermidin zvyšují odpovědi NMDA receptorů nezávisle na napětí, mechanismem na glycinu závislým i nezávislým. Glycin-dependentní

potenciace se vyskytuje u receptorů obsahujících GluN2A a GluN2B podjednotky prostřednictvím zvýšení afinity ke glycinu (Williams *et al.*, 1994), která je výsledkem alosterické interakce mezi polyaminy vázanými k ATD a glycinem navázaným na LBD (Han *et al.*, 2008). Glycin-nezávislá polyaminová potenciace NMDA receptorů se vyskytuje při saturujících koncentracích glycinu pouze u receptorů obsahujících GluN2B podjednotku (Pahk *et al.*, 1997). Vazba polyaminů mění disociační konstantu protonového senzoru, čímž snižuje tonickou inhibici NMDA receptorů při fyziologickém pH (Traynelis *et al.*, 1995).

4.2.4 Neurosteroidy

Neurosteroidy jsou steroidní látky syntetizované v CNS savců, které zde ovlivňují aktivitu ligandem aktivovaných iontových kanálů. NMDA receptory mohou být endogenními sulfátovými neurosteroidy modulovány buď pozitivně, nebo negativně. Sulfátová nebo jiná negativně nabitá skupina na C3 uhlíku je pro aktivitu nezbytná (Park-Chung *et al.*, 1997). Zalomená struktura steroidního jádra s úhlem téměř 90° způsobuje inhibici, zatímco neurosteroidy s více planárním aromatickým jádrem NMDA receptory potencují (Weaver *et al.*, 2000).

Potenciace neurosteroidy je závislá na podjednotkovém složení receptorů. Přirozeně se vyskytující neurosteroid pregnenolon sulfát (PS) potencuje receptory obsahující GluN2A/GluN2B podjednotky až osmkrát silněji, než receptory obsahující GluN2C/GluN2D podjednotky při stejné koncentraci glutamátu (Horak *et al.*, 2004). Kromě potenciace má PS na rekombinantní NMDA receptory také inhibiční efekt; inhibice se je silnější u GluN2C a GluN2D podjednotek nežli u GluN2A/GluN2B podjednotek (Horak *et al.*, 2006).

Dalším sulfátovým neurosteroidem je pregnanolon sulfát (3 α 5 β S), který má na NMDA receptory inhibiční účinek. 3 α 5 β S snižuje pravděpodobnost a dobu otevření iontového kanálu a zvyšuje desenzitizaci receptoru (Kussius *et al.*, 2009; Park-Chung *et al.*, 1997). Inhibice 3 α 5 β S je slabě podjednotkově selektivní, se zhruba dvakrát vyšším účinkem na receptory obsahující GluN2C/GluN2D než GluN2A/GluN2B podjednotky (Petrovic *et al.*, 2005). Pozitivní a negativní steroidní modulátory NMDA receptorů účinkují na specifických, od sebe odlišných, extracelulárně orientovaných místech (Park-Chung *et al.*, 1997). Extracelulární smyčka mezi třetí a čtvrtou transmembránovou doménou GluN2 podjednotky má význam jak pro potenciační, tak inhibiční efekt PS (Horak *et al.*, 2006).

4.2.5 Nespecifická modulace

K modulátorům NMDA receptorů patří i osmotický a hydrostatický tlak. Změny v těchto veličinách mohou být způsobeny molekulami lysofosfolipidů a arachidonové kyseliny, které se inkorporují do membránové dvojvrstvy a způsobují tak její zakřivení. Molekuly s velkou hydrofilní „hlavou“ způsobují stlačení, které vede ke snížení pravděpodobnosti otevření; molekuly s malou hydrofilní „hlavou“ naopak způsobují natažení membrány, které se odrazí ve zvýšené pravděpodobnosti otevření receptoru (Casado *et al.*, 1998). Mechanosensitivita NMDA receptorů by mohla mít důležitou roli v oblastech neuronu, kde dochází ke změnám v pnutí membrány, například v synaptických trnech (Paoletti *et al.*, 1994).

5 Ontogeneze NMDA receptorů

GluN1 podjednotka je pro funkci NMDA receptoru nezbytná a exprese genu pro GluN1 probíhá ve všech oblastech mozku v průběhu ontogeneze téměř shodně. Naproti tomu v případě GluN2 a GluN3 podjednotek dochází během vývoje ke změnám exprese (Monyer *et al.*, 1994).

Důkazem tohoto tvrzení je změna exprese GluN1/GluN2B receptorů převládající v prvním týdnu postnatálního vývoje v kortexu, hipokampu a mozečku potkana na expresi GluN1/GluN2A receptorů (van Zundert *et al.*, 2004). Receptory obsahující GluN2D podjednotku jsou nejrozšířenější v časném postnatálním stádiu v mezimozku, mozkovém kmeni a mozečku. GluN2B a GluN2D podjednotky se objevují prenatalně, kdežto receptory obsahující GluN2A a GluN2C podjednotky lze poprvé detekovat až po narození (Monyer *et al.*, 1994).

GluN3A podjednotka je primárně exprimována v časném postnatálním vývoji, zatímco GluN3B se nachází v dospělém mozkovém kmeni a páteřní míše (Petrálie *et al.*, 2008). GluN3A se zdá být podjednotkou kritickou pro synaptogenezi; následné snížení exprese GluN3A po vytvoření synapse je důležité pro její maturaci. Avšak mechanismus, který odstraňuje a nahrazuje synaptické NMDA receptory, nebyl dosud spolehlivě objasněn (Perez-Otano *et al.*, 2006).

Složení synaptických NMDA receptorů se po tvorbě synapse rychle mění. Synapse obsahující převážně GluN1/GluN2B heteromery představují „imaturovaná“ místa, zatímco „maturované“ synapse exprimují NMDA receptory s pravděpodobně triheteromerním

uspořádáním (GluN1/GluN2A/B) a odlišným podjednotkovým složením (Tovar *et al.*, 1999). Změny v podjednotkovém složení mohou mimo jiné být zodpovědné za úbytek NMDA receptory zprostředkovaného EPSC, pozorovatelného během vývoje (Hestrin, 1992).

S využitím ifenprodilu, selektivního antagonisty GluN2B podjednotek, bylo dokázáno, že extrasynaptické NMDA receptory jsou převážně GluN1/GluN2B heteromery. Synaptické receptory naproti tomu obsahují ifenprodil-necitlivé podjednotky. V totožném vývojovém stádiu extrasynaptické NMDA receptory převyšují synaptické v poměru 3:1 (Tovar *et al.*, 1999).

6 Plasticita synapsí

Rychlý a vysokofrekvenční sled impulsů na pyramidální neurony v hippocampu iniciuje dlouhotrvající zesílení synaptického přenosu. Tato forma dlouhodobé potenciace je úzce spojena s NMDA receptory. Aktivace postsynaptických NMDA receptorů mění denzitu AMPA receptorů v postsynaptické membráně, čímž spouští dlouhodobou změnu v AMPA receptory zprostředkovaném synaptickém přenosu (Sharma *et al.*, 2006). Tento typ plasticity je nejvíce studovanou formou dlouhodobé potenciace a pokládá se za buněčnou podstatu učení a paměti (Kessels *et al.*, 2009).

Vznik AMPA zprostředkovaných proudů v tzv. tichých synapsích, což jsou synapse obsahující NMDA receptory bez funkčních AMPA receptorů, je vysvětlen aktivací NMDA receptorů. Teorie, která byla experimentálně silně podpořena, navrhuje, že vstup Ca^{2+} po aktivaci NMDA receptorů spouští inserci nascentních AMPA receptorů do postsynaptické membrány (Pelkey *et al.*, 2008).

7 Terapeutický význam NMDA receptorů

Glutamátové receptory jsou pro normální funkci CNS naprosto esenciální. Avšak jejich nadměrná aktivace glutamátem přispívá k poškození neuronů při mnoha neurologických poruchách, počínaje akutním traumatickým a ischemickým poškozením mozku (Kalia *et al.*, 2008) a konče chronickými neurodegenerativními onemocněními jako Alzheimerovou, Parkinsonovou či Huntingtonovou chorobou (Chen *et al.*, 2006).

7.1 Neuropatická bolest

Zvýšená citlivost a přecitlivělost na bolest (hyperalgesie) vychází z nedostatečné adaptability nervových drah vedoucích bolest. Jelikož NMDA receptory mají úlohu v centrální sensitizaci, jejich antagonisté mohou snižovat indukci hypersensitivních stavů (Woolf *et al.*, 1991). Preklinická literatura naznačuje, že inhibice NMDA receptorů předchází vývoji neuropatické bolesti, nebo ji snižuje (Petrenko *et al.*, 2003). Tato data navrhuje, že blokáda NMDA receptorů může poskytovat účinnou krátkodobou léčbu neuropatické bolesti a může předcházet vzniku hyperalgesie.

7.2 Schizofrenie

Většina farmaceutického vývoje týkajícího se NMDA receptorů je zaměřena na jejich antagonisty. Avšak existuje i podstatný terapeutický potenciál ve zvyšování aktivity NMDA receptorů. Hypofunkce NMDA receptorů je významná při schizofrenii. Původní zjištění, že inhibitory NMDA receptorů indukují změny v chování blízce podobné symptomům schizofrenie (Luby *et al.*, 1959), vedlo k vytvoření hypotézy, že dysfunkce NMDA receptorů může být klíčovým faktorem této choroby (Olney *et al.*, 1999).

Jedním z účinků antagonistů NMDA receptorů je snížení excitace interneuronů, která se projevuje jako disinhibice pyramidálních buněk. Následná hyperaktivita pyramidálních buněk, zejména těch v hipokampu, pak může vyvolat hyperdopaminergní stav, který vyvolává psychózu (Lisman *et al.*, 2008). Antibiotikum D-cykloserin bylo první syntetickou sloučeninou použitou pro primární antipsychotickou terapii (Sheinin *et al.*, 2001). Navzdory počátečním nadějím nebyly účinky této látky spolehlivě prokázány; avšak preklinická data při pravidelném podávání naznačují zlepšení negativních symptomů v porovnání s kontrolou (Goff *et al.*, 2008).

7.3 Parkinsonova choroba

Glutamatergní systém je už dlouhou dobu cílem při léčbě Parkinsonovy choroby. Abnormální aktivita subtalamického jádra hraje centrální patofyziologickou úlohu v projevech Parkinsonovy choroby a antagonisté NMDA receptorů mohou tuto aktivitu selektivně snížit. Velmi nízké dávky antagonistů NMDA receptorů značně zesilují terapeutické efekty dopaminergních agonistů (Greenamyre *et al.*, 1991). Nízkoafinitní antagonist NMDA receptorů amantadin, který se používá jako přídatek k L-DOPA terapii, mírně zesiluje antiparkinsonické účinky léčby a snižuje dyskinezi (Crosby *et al.*, 2003).

7.4 Alzheimerova demence

Alzheimerova demence (AD) je progresivní neurodegenerativní onemocnění počínající ztrátami paměti a poruchami kognitivních funkcí. Střední stádium AD je charakterizováno prudkým poklesem kognitivních funkcí a v těžkém stádiu choroby pacienti projevují závažné poruchy kognitivních a behaviorálních funkcí vedoucích až k rozpadu osobnosti. Stabilizací běžných denních funkcí a behaviorálních schopností lze proto zvýšit kvalitu života pacientů trpících AD.

Klinické studie demonstrovaly u skupiny pacientů trpících střední až těžkou AD, že užívání memantinu přináší výrazné zlepšení kognitivních a behaviorálních symptomů AD společně s aktivitami denního života (Winblad *et al.*, 2007). Memantin, původně syntetizovaný v 60. letech 20. století jako lék na hypoglykémii, se pro léčbu AD začal používat v roce 2000 a byl doposud schválen v USA, Kanadě a Evropě. Je zatím jediným léčivem schváleným pro léčbu pokročilejších stadií AD (Kalia *et al.*, 2008). Účinek memantinu v léčbě AD dokazuje význam terapií zaměřených na NMDA receptory v klinické neurologii a poskytuje tak pádný důvod pro vývoj podobných strategií léčby.

8 Závěr

Modulátory glutamátových receptorů mají široký význam v prevenci a terapii chronických i akutních onemocnění mozku. Vedle uvedených chorob jde také o akutní neuronální smrt, způsobenou mozkovou ischemií a traumatickým poškozením mozku (Kalia *et al.*, 2008). Předpokládá se, že v roce 2020 bude cévní mozková příhoda jednou z nejčastějších příčin invalidity a smrti (Michaud *et al.*, 2001). Většina neuroprotektivních látek založených na antagonismu NMDA receptorů však neprošla klinickými testy kvůli vedlejším účinkům, které negativně ovlivňují normální funkci mozku.

NMDA receptory mají v mozku roli při normální i abnormální funkci nervového systému; je proto třeba zablokovat nadměrnou aktivitu receptorů bez ovlivnění jejich fyziologické funkce. Antagonisty lze třídit podle místa jejich účinku; účinkující na místě pro agonistu (NMDA), pro koagonistu (glycin) nebo na specifických modulačních místech, či v rámci iontového kanálu. Kompetitivní antagonisté NMDA a glycinu, ačkoli předcházejí glutamátové neurotoxicitě, způsobují celkovou inhibici NMDA receptorů, a tudíž je nelze v klinické praxi použít. Akompetitivní blokátory otevřeného kanálu jsou proto nejvhodnější strategií, neboť blokace kanálu vyžaduje jeho předchozí aktivaci. Takové vlastnosti umožňují přednostně blokovat nadměrně aktivované NMDA receptory, které mají význam v patologii, a ponechávat esenciální úroveň aktivity (Chen *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Memantin je prvním klinicky tolerovaným a zároveň efektivním antagonistou při NMDA receptory zprostředkované neurotoxicitě. Je tedy účinným léčivem na Alzheimerovu chorobu (Winblad *et al.*, 2007) a v současné době je klinicky testován pro léčbu dalších onemocnění, a to sice Parkinsonovy choroby a dalších demencí (Aarsland *et al.*, 2009), glaukomu (Osborne, 2009) a neuropatických bolestí (Collins *et al.*, 2010). Nicméně neuroprotekcí při glaukomu se stále nedaří prokázat (Osborne, 2009).

Další třída sloučenin, která přitahuje pozornost pro svůj farmaceutický potenciál, jsou antagonisté NMDA receptorů selektivní pro GluN2B podjednotku. Sílicí názor na pravděpodobnou extrasynaptickou lokalizaci receptorů obsahujících GluN2B podjednotku objasňuje jejich terapeutický význam (Chazot, 2004). Antagonisté selektivní pro GluN2B účinkují v širokém spektru preklinických modelů patologií CNS, včetně chronické a akutní bolesti (Petrenko *et al.*, 2003), mrtvice a poškození hlavy (Pahk *et al.*, 1997), dyskineze a demence (Crosby *et al.*, 2003).

9 Seznam použité literatury

Aarsland D, Ballard C, Walker Z, Bostrom F, Alves G, Kossakowski K, *et al.* (2009). Memantine in patients with Parkinson's disease dementia or dementia with Lewy bodies: a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet neurology* **8**(7): 613-618.

Antonov SM, Johnson JW (1999). Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg(2+). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(25): 14571-14576.

Ascher P, Nowak L (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *The Journal of physiology* **399**: 247-266.

Atlason PT, Garside ML, Meddows E, Whiting P, McIlhinney RAJ (2007). N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *The Journal of biological chemistry* **282**(35): 25299-25307.

Banke TG, Dravid SM, Traynelis SF (2005). Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(1): 42-51.

Basu AC, Tsai GE, Ma CL, Ehmsen JT, Mustafa AK, Han L, *et al.* (2009). Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Molecular psychiatry* **14**(7): 719-727.

Beck C, Wollmuth LP, Seeburg PH, Sakmann B, Kuner T (1999). NMDAR channel segments forming the extracellular vestibule inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **22**(3): 559-570.

Benveniste H (1989). Brain microdialysis. *Journal of neurochemistry* **52**(6): 1667-1679.

Bi X, Rong Y, Chen J, Dang S, Wang Z, Baudry M (1998). Calpain-mediated regulation of NMDA receptor structure and function. *Brain research* **790**(1-2): 245-253.

Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW (1997). Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *Journal of neurophysiology* **77**(1): 309-323.

Bowie D, Mayer ML (1995). Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* **15**(2): 453-462.

Brothwell SL, Barber JL, Monaghan DT, Jane DE, Gibb AJ, Jones S (2008). NR2B- and NR2D-containing synaptic NMDA receptors in developing rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones. *The Journal of physiology* **586**(3): 739-750.

Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Gunther W, Seeburg PH, *et al.* (1992). Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* **257**(5075): 1415-1419.

- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995). Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *The Journal of physiology* **485** (Pt 2): 403-418.
- Casado M, Ascher P (1998). Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity. *The Journal of physiology* **513** (Pt 2): 317-330.
- Clarke RJ, Johnson JW (2006). NMDA receptor NR2 subunit dependence of the slow component of magnesium unblock. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(21): 5825-5834.
- Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* **56**(1): 2-5.
- Collins S, Sigtermans MJ, Dahan A, Zuurmond WW, Perez RS (2010). NMDA receptor antagonists for the treatment of neuropathic pain. *Pain Med* **11**(11): 1726-1742.
- Crosby N, Deane KH, Clarke CE (2003). Amantadine in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD003468.
- Curtis DR, Watkins JC (1963). Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *The Journal of physiology* **166**: 1-14.
- Dickinson R, Peterson BK, Banks P, Simillis C, Martin JC, Valenzuela CA, *et al.* (2007). Competitive inhibition at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor by the anesthetics xenon and isoflurane: evidence from molecular modeling and electrophysiology. *Anesthesiology* **107**(5): 756-767.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews* **51**(1): 7-61.
- Do KQ, Mattenberger M, Streit P, Cuenod M (1986). In vitro release of endogenous excitatory sulfur-containing amino acids from various rat brain regions. *Journal of neurochemistry* **46**(3): 779-786.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, *et al.* (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**(5360): 69-77.
- Dravid SM, Burger PB, Prakash A, Geballe MT, Yadav R, Le P, *et al.* (2010). Structural Determinants of D-Cycloserine Efficacy at the NR1/NR2C NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience* **30**(7): 2741-2754.
- Dravid SM, Prakash A, Traynelis SF (2008). Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *The Journal of physiology* **586**(Pt 18): 4425-4439.
- Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, *et al.* (2007). Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Molecular pharmacology* **72**(4): 907-920.

- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF (2004). Glutamate receptor gating. *Critical reviews in neurobiology* **16**(3): 187-224.
- Erreger K, Traynelis SF (2005). Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *The Journal of physiology* **569**(Pt 2): 381-393.
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, Neyton J (2000). Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**(3): 683-694.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, *et al.* (1994). Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* **13**(2): 325-338.
- Furukawa H, Gouaux E (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* **22**(12): 2873-2885.
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**(7065): 185-192.
- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P (2008). Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57**(1): 80-93.
- Giffard RG, Monyer H, Christine CW, Choi DW (1990). Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain research* **506**(2): 339-342.
- Goff DC, Cather C, Gottlieb JD, Evins AE, Walsh J, Raeke L, *et al.* (2008). Once-weekly D-cycloserine effects on negative symptoms and cognition in schizophrenia: an exploratory study. *Schizophrenia research* **106**(2-3): 320-327.
- Greenamyre JT, O'Brien CF (1991). N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Archives of neurology* **48**(9): 977-981.
- Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB (2003). AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* **40**(4): 763-774.
- Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Full C, Fukiwake T, *et al.* (2008). Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of neurochemistry* **107**(6): 1566-1577.
- Hayashi T (1954). The effect of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.* **3**: 183.
- Hayashi T, Thomas GM, Huganir RL (2009). Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron* **64**(2): 213-226.

- Hestrin S (1992). Developmental regulation of NMDA receptor-mediated synaptic currents at a central synapse. *Nature* **357**(6380): 686-689.
- Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2006). Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* **137**(1): 93-102.
- Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(46): 10318-10325.
- Huettnner JE, Bean BP (1988). Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(4): 1307-1311.
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, *et al.* (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* **415**(6873): 793-798.
- Chazot PL (2004). The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Current medicinal chemistry* **11**(3): 389-396.
- Chen GQ, Cui CH, Mayer ML, Gouaux E (1999). Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* **402**(6763): 817-821.
- Chen HS, Lipton SA (2005). Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **314**(3): 961-971.
- Chen HSV, Lipton SA (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of neurochemistry* **97**(6): 1611-1626.
- Chen N, Li B, Murphy TH, Raymond LA (2004). Site within N-Methyl-D-aspartate receptor pore modulates channel gating. *Molecular pharmacology* **65**(1): 157-164.
- Choi YB, Lipton SA (1999). Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn²⁺ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**(1): 171-180.
- Jahr CE, Jessell TM (1985). Synaptic transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in culture: antagonism of monosynaptic excitatory postsynaptic potentials and glutamate excitation by kynurenate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **5**(8): 2281-2289.
- Jatzke C, Hernandez M, Wollmuth LP (2003). Extracellular vestibule determinants of Ca²⁺ influx in Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels. *The Journal of physiology* **549**(Pt 2): 439-452.
- Jin RS, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003). Structural basis for partial

- agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* **6**(8): 803-810.
- Johnson JW, Ascher P (1987a). Glycine Potentiates the Nmda Response in Cultured Mouse-Brain Neurons. *Nature* **325**(6104): 529-531.
- Johnson JW, Ascher P (1987b). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**(6104): 529-531.
- Kalia LV, Kalia SK, Salter MW (2008). NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet neurology* **7**(8): 742-755.
- Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2009). Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *Embo J* **28**(24): 3910-3920.
- Kessels HW, Malinow R (2009). Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* **61**(3): 340-350.
- Kleinschmidt A, Bear MF, Singer W (1987). Blockade of "NMDA" receptors disrupts experience-dependent plasticity of kitten striate cortex. *Science* **238**(4825): 355-358.
- Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1998). N-terminal domains in the NR2 subunit control desensitization of NMDA receptors. *Neuron* **20**(2): 317-327.
- Kuner T, Beck C, Sakmann B, Seeburg PH (2001). Channel-lining residues of the AMPA receptor M2 segment: structural environment of the Q/R site and identification of the selectivity filter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(12): 4162-4172.
- Kuner T, Seeburg PH, Guy HR (2003). A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors? *Trends in neurosciences* **26**(1): 27-32.
- Kuner T, Wollmuth LP, Karlin A, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **17**(2): 343-352.
- Kussius CL, Kaur N, Popescu GK (2009). Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(21): 6819-6827.
- Kuusinen A, Abele R, Madden DR, Keinänen K (1999). Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *The Journal of biological chemistry* **274**(41): 28937-28943.
- Legendre P, Westbrook GL (1990). The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *The Journal of physiology* **429**: 429-449.
- Leuschner WD, Hoch W (1999). Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *The Journal of biological chemistry* **274**(24): 16907-16916.

- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, *et al.* (2008). Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends in neurosciences* **31**(5): 234-242.
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS, Kelley R (1959). Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *A.M.A. archives of neurology and psychiatry* **81**(3): 363-369.
- Matsuda K, Fletcher M, Kamiya Y, Yuzaki M (2003). Specific assembly with the NMDA receptor 3B subunit controls surface expression and calcium permeability of NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(31): 10064-10073.
- Mayer ML (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**(7083): 456-462.
- Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Clements J (1989). Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* **338**(6214): 425-427.
- Mayer ML, Westbrook GL (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *The Journal of physiology* **394**: 501-527.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**(5965): 261-263.
- McBain CJ, Kleckner NW, Wyrick S, Dingledine R (1989). Structural requirements for activation of the glycine coagonist site of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Molecular pharmacology* **36**(4): 556-565.
- Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, *et al.* (2001). Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of biological chemistry* **276**(22): 18795-18803.
- Michaud CM, Murray CJ, Bloom BR (2001). Burden of disease--implications for future research. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **285**(5): 535-539.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**(3): 529-540.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, *et al.* (1992). Heteromeric Nmda Receptors - Molecular and Functional Distinction of Subtypes. *Science* **256**(5060): 1217-1221.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**(6859): 37-42.
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* **354**(6348): 31-37.

- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, *et al.* (1998). Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* **1**(8): 659-667.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiat Res* **33**(6): 523-533.
- Osborne NN (2009). Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta ophthalmologica* **87**(4): 450-454.
- Pahk AJ, Williams K (1997). Influence of extracellular pH on inhibition by ifenprodil at N-methyl-D-aspartate receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience letters* **225**(1): 29-32.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, *et al.* (2006). Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* **125**(4): 775-784.
- Paoletti P, Ascher P (1994). Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons. *Neuron* **13**(3): 645-655.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J (2000). Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28**(3): 911-925.
- Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular pharmacology* **52**(6): 1113-1123.
- Parsons CG, Quack G, Bresink I, Baran L, Przegalinski E, Kostowski W, *et al.* (1995). Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* **34**(10): 1239-1258.
- Pelkey KA, McBain CJ (2008). Target-cell-dependent plasticity within the mossy fibre-CA3 circuit reveals compartmentalized regulation of presynaptic function at divergent release sites. *The Journal of physiology* **586**(6): 1495-1502.
- Perez-Otano I, Lujan R, Tavalin SJ, Plomann M, Modregger J, Liu XB, *et al.* (2006). Endocytosis and synaptic removal of NR3A-containing NMDA receptors by PACSIN1/syndapin1. *Nat Neurosci* **9**(5): 611-621.
- Perez-Otano I, Schulteis CT, Contractor A, Lipton SA, Trimmer JS, Sucher NJ, *et al.* (2001). Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(4): 1228-1237.
- Peters S, Koh J, Choi DW (1987). Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science* **236**(4801): 589-593.

- Petralia RS, Wenthold PG (2008). NMDA receptors, in *The Glutamate Receptors* (Gereau RW and Swanson GT eds) pp 45-98, Humana Press, Totowa, NJ.
- Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K (2003). The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. *Anesthesia and analgesia* **97**(4): 1108-1116.
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. (2005). 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(37): 8439-8450.
- Pitchford S, Day JW, Gordon A, Mochly-Rosen D (1992). Nicotinic acetylcholine receptor desensitization is regulated by activation-induced extracellular adenosine accumulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**(11): 4540-4544.
- Premkumar LS, Auerbach A (1996). Identification of a high affinity divalent cation binding site near the entrance of the NMDA receptor channel. *Neuron* **16**(4): 869-880.
- Priestley T, Laughton P, Myers J, Le Bourdelles B, Kerby J, Whiting PJ (1995). Pharmacological properties of recombinant human N-methyl-D-aspartate receptors comprising NR1a/NR2A and NR1a/NR2B subunit assemblies expressed in permanently transfected mouse fibroblast cells. *Molecular pharmacology* **48**(5): 841-848.
- Prieto ML, Wollmuth LP (2010). Gating modes in AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**(12): 4449-4459.
- Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH (2005). Subunit assembly of N-methyl-d-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* **280**(26): 24923-24930.
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005). The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(2): 308-317.
- Ren H, Honse Y, Karp BJ, Lipsky RH, Peoples RW (2003). A site in the fourth membrane-associated domain of the N-methyl-D-aspartate receptor regulates desensitization and ion channel gating. *The Journal of biological chemistry* **278**(1): 276-283.
- Saglietti L, Dequidt C, Kamieniarz K, Rousset MC, Valnegri P, Thoumine O, *et al.* (2007). Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* **54**(3): 461-477.
- Sharma K, Fong DK, Craig AM (2006). Postsynaptic protein mobility in dendritic spines: long-term regulation by synaptic NMDA receptor activation. *Molecular and cellular neurosciences* **31**(4): 702-712.
- Sheinin A, Shavit S, Benveniste M (2001). Subunit specificity and mechanism of action of NMDA partial agonist D-cycloserine. *Neuropharmacology* **41**(2): 151-158.
- Schneggenburger R (1998). Altered voltage dependence of fractional Ca²⁺ current in N-

- methyl-D-aspartate channel pore mutants with a decreased Ca²⁺ permeability. *Biophysical journal* **74**(4): 1790-1794.
- Schneggenburger R (1996). Simultaneous measurement of Ca²⁺ influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophysical journal* **70**(5): 2165-2174.
- Schorge S, Colquhoun D (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**(4): 1151-1158.
- Schuler T, Mesic I, Madry C, Bartholomaeus I, Laube B (2008). Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *The Journal of biological chemistry* **283**(1): 37-46.
- Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, *et al.* (2006). Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* **9**(4): 501-510.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**(7274): 745-756.
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417**(6886): 245-253.
- Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996). Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *The Journal of physiology* **492** (Pt 1): 129-142.
- Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, *et al.* (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**(6748): 63-69.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999). The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**(10): 4180-4188.
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**(5212): 873-876.
- Traynelis SF, Wahl P (1997). Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *The Journal of physiology* **503** (Pt 3): 513-531.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, *et al.* (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* **62**(3): 405-496.
- van Zundert B, Yoshii A, Constantine-Paton M (2004). Receptor compartmentalization and trafficking at glutamate synapses: a developmental proposal. *Trends in neurosciences* **27**(7): 428-437.

- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2002). Intracellular domains of NR2 alter calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Molecular pharmacology* **61**(3): 595-605.
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2001). A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci* **4**(6): 587-596.
- Vyklicky L, Jr. (1993). Calcium-mediated modulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses in cultured rat hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **470**: 575-600.
- Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML (1990a). Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **428**: 313-331.
- Vyklicky L, Jr., Vlachova V, Krusek J (1990b). The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *The Journal of physiology* **430**: 497-517.
- Watanabe J, Beck C, Kuner T, Premkumar LS, Wollmuth LP (2002). DRPEER: a motif in the extracellular vestibule conferring high Ca²⁺ flux rates in NMDA receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**(23): 10209-10216.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca²⁺ accumulation and cell death. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **293**(3): 747-754.
- Williams K (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular pharmacology* **44**(4): 851-859.
- Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB (1994). Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Molecular pharmacology* **45**(5): 803-809.
- Winblad B, Jones RW, Wirth Y, Stoffler A, Mobius HJ (2007). Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **24**(1): 20-27.
- Wollmuth LP, Kuner T, Seeburg PH, Sakmann B (1996). Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channels. *The Journal of physiology* **491** (Pt 3): 779-797.
- Wollmuth LP, Sakmann B (1998). Different mechanisms of Ca²⁺ transport in NMDA and Ca²⁺-permeable AMPA glutamate receptor channels. *The Journal of general physiology* **112**(5): 623-636.
- Woolf CJ, Thompson SWN (1991). The Induction and Maintenance of Central

Sensitization Is Dependent on N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptor Activation - Implications for the Treatment of Postinjury Pain Hypersensitivity States. *Pain* **44**(3): 293-299.

Wyllie DJ, Behe P, Colquhoun D (1998). Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *The Journal of physiology* **510** (Pt 1): 1-18.

Yao Y, Harrison CB, Freddolino PL, Schulten K, Mayer ML (2008). Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *Embo J* **27**(15): 2158-2170.

Yao Y, Mayer ML (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**(17): 4559-4566.

Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF (2009). Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**(39): 12045-12058.

Zarei MM, Dani JA (1994). Ionic permeability characteristics of the N-methyl-D-aspartate receptor channel. *The Journal of general physiology* **103**(2): 231-248.

Zhang X, Nadler JV (2009). Postsynaptic response to stimulation of the Schaffer collaterals with properties similar to those of synaptosomal aspartate release. *Brain research* **1295**: 13-20.

Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, *et al.* (2001). Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* **4**(9): 894-901.

Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* **388**(6644): 769-773.